

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Anni Rebane

Ektodüsplasiini ekspressioon punakõrv-ilukilpkonna

***Trachemys scripta* arengus**

Bakalaureusetöö

Juhendajad PhD Kersti Lilleväli

MSc Triin Tekko

TARTU 2014

SISUKORD

| | |
|---|----|
| KASUTATUD LÜHENDID | 4 |
| SISSEJUHATUS | 6 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE | 7 |
| 1.1 Kilpkonna kilbi areng | 7 |
| 1.2 Epiteel-mesenhüüm interaktsioonid naha tekiste arengus | 8 |
| 1.3 Ektodüsplasiin..... | 8 |
| 1.3.1 Eda ja Eda-A1-Edar signaalrada | 8 |
| 1.3.2 Eda signaalrada inimeses | 11 |
| 1.3.2.1 Ektodermaalne düsplaasia | 11 |
| 1.3.2.2 <i>EDA</i> ekspressioon inimeses..... | 11 |
| 1.3.3 Eda signaalrada hiires..... | 12 |
| 1.3.3.1 Eda signaalraja mutatsioonidest põhjustatud defektid..... | 12 |
| 1.3.3.2 <i>Eda</i> ekspressioon hiires | 12 |
| 1.3.4 Eda signaalraja mutatsioonidest tingitud defektid sebrakalas (<i>Danio rerio</i>) | 13 |
| 2. EKSPERIMENTAALNE OSA | 14 |
| 2.1 Töö eesmärgid..... | 14 |
| 2.2 Materjal ja meetoodika | 14 |
| 2.2.1 Kasutatud punakõrv-ilukilpkonnade embrüod | 14 |
| 2.2.2. Plasmiidi paljundamine | 14 |
| 2.2.3. Plasmiidi eraldamine bakterist | 14 |
| 2.2.4 DIG-märgistatud RNA proovide süntees | 14 |
| 2.2.5 <i>Whole-mount</i> embrüote mRNA <i>in situ</i> hübridisatsioon | 15 |
| 2.2.5.1 Eeltöötlus..... | 15 |
| 2.2.5.2 Hübridisatsioon..... | 15 |

| | |
|--|----|
| 2.2.5.3 Hübridisatsioonijärgsed pesud..... | 16 |
| 2.2.5.4 Immunohistokeemia, värvimine ja pildistamine | 16 |
| 2.2.6 mRNA <i>in situ</i> hübridisatsioon parafiinilõikudel | 16 |
| 2.2.6.1 Parafiini sisestamine ja parafiinilõikude valmistamine | 16 |
| 2.2.6.2 Eeltöötlus | 17 |
| 2.2.6.3 Hübridisatsioon..... | 17 |
| 2.2.6.4 Hübridisatsioonijärgsed pesud..... | 17 |
| 2.2.6.5 Immunohistokeemia, värvimine ja pildistamine | 17 |
| 2.3 Tulemused..... | 18 |
| 2.3.1 <i>In situ</i> hübridisatsioon punakõrv-ilukilpkonnade embrüotel | 18 |
| 2.3.2 <i>In situ</i> hübridisatsioon parafiinilõikudel | 18 |
| 2.4 Arutelu..... | 20 |
| KOKKUVÕTE | 23 |
| SUMMARY | 25 |
| TÄNUSÕNAD | 27 |
| KASUTATUD KIRJANDUS | 28 |
| LIHTLITSENTS..... | 33 |

KASUTATUD LÜHENDID

BMP – luu morfogeneetiline valk (ingl k *bone morphogenic protein*)

BR – blokeeriv reagent (ingl k *Blocking Reagent*)

CR – karapaksi vall (ingl k *carapacial ridge*)

DIG – digoksüeniin

E – embrüonaalne arengupäev

Eda – ektodüsplasiin

Edar – ektodüsplasiini retseptor

Edaradd – ektodüsplasiini retseptor-seonduv surma domään (ingl k *Edar-associated death domain*)

FGF – fibroblasti kasvufaktor (ingl k *fibroblast growth factor*)

fls – uimedeta (ingl k *finless*)

HED – hüpohidrootiline/anhidrootiline ektodermaalne düsplaasia

IKK – IκB kinaas

IκB – NF-κB inhibiitor (ingl k *inhibitor of NF-κB*)

IPTG – isopropüül β-D-1-tiogalaktopüranosiid

LB – Luria-Bertani sööde

MilliQ – deioniseeritud vesi firmalt Millipore

Nkt – soomusevigadega, „alasti“ (sks k *Nackt*)

NF-κB – tuumafaktor κB (ingl k *nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NTMT – alkaliini fosfataasi puhver

PBS – naatriumfosfaat-puhverdatud soolalahus (ingl k *phosphate buffered saline*)

PBT – naatriumfosfaat-puhverdatud soolalahus ja Tween20

PFA – paraformaldehüüd

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat (ingl k *sodium dodecyl sulfate*)

Shh – *Sonic hedgehog* signaalmolekulide perekond

SSC – naatriumtsitraat-puhverdatud soolalahus (ingl k *saline-sodium citrate buffer*)

TBST – Tris-puhverdatud soolalahus ja Tween20 (ingl k *Tris-Buffered Saline and Tween20*)

T. scripta – punakõrv-ilukilpkonn (ld k *Trachemys scripta*)

Ta – Tabby mutatsioon

TGF- β – transformeeriv kasvufaktor β (ingl k *transforming growth factor β*)

TNF – kasvaja nekroosifaktor (ingl k *tumor necrosis factor*)

Traf – TNF retseptor-seonduv faktor (ingl k *TNF receptor-associated factor*)

Wnt – *Wingless/int* signaalmolekulide perekond

wt – metsiktüüpi hiir (ingl k *wild-type*)

X-Gal – 5-bromo-4-klooro-3-indolüül- β -D-galaktopüranosiid

SISSEJUHATUS

Kilpkonnalised, kes lahknesid teistest roomajatest Permi ajastul ligikaudu 270 miljonit aastat tagasi, omavad iseloomulikku luulist kilprüüd. Kilpkonna kilp on evolutsiooniliselt uudne struktuur, mis koosneb selgmisest seljakilbist ehk karapaksist ning kõhtmisest kõhukilbist ehk plastronist, mis on külgedelt sildade abil ühendatud. Seljakilbi moodustamiseks on vajalik karapaksi vall (CR, *carapacial ridge*), mis moodustub jäsemepungade vahel ning laieneb anterioorselt ja posterioorselt embrüo külgedel, et kilpkonna roided siseelundite ümbritsemise asemel seljakilbi moodustaksid.

Ektodüsplasiin (Eda), mis on kasvaja nekroosifaktori perekonna valk, osaleb peamiselt naha tekiste: näärmete, karvade ja hammaste arengus imetajatel ning soomuste ja uimede arengus kaladel. Eda olulisust on uuritud Eda signaalraja mutatsioonidest põhjustatud vigu uurides, sest defektiga isenditel on vastavaid naha tekiseid vähe, need arenevad ebaharilikeks või puuduvad täielikult, seega saab vastavate mutatsioonidega fenotüübi kaudu uurida Eda funktsiooni naha tekistes. Vähem on uuritud *Eda* ekspressiooni mesodermaalset päritolu organites, sest mutatsioonidest põhjustatud väärarengud (luudes) puuduvad või pole nii ilmsed kui naha tekiste hälbed.

Käesoleva töö eesmärk on kirjeldada ektodüsplasiini ja tema retseptori ekspressiooni punakõrv-ilukilpkonna *Trachemys scripta* embrüonaalses arengus ning võrrelda *Eda* ekspressiooni kilpkonnas eelnevalt kirjeldatud ektodüsplasiini ekspressiooniga selgroogsetes.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Kilpkonna kilbi areng

Kilpkonna kilbi arengu eripära ei väljendu uute signaalradade tekkimises, vaid olemasolevate signaalradade ümberkorralduses. Kilbi embrüonaalses arengus toimub dorsaalse kehaseina dermise ulatuslik hüpertroofia (liigpaisumine) ja sellele järgnev õlavöötme ja toeskeleti (ehk aksiaalskeleti) tavapärase suhte ümberkorraldus: rangluud on kõhukilbiga kokku kasvanud (Alibardi ja Thompson 1999a) ja abaluu asub kilprüüd moodustava rinnakorvi sees (Lyson ja Joyce, 2012).

Kilpkonnaliste seltsi *Testudines* peamine uuendus on karapaksi vall, mis tekib ektodermi ja mesodermi paisena, takistab roiete kasvu kõhu poole (rindkere ümbritsemist) ning suunab nad seljakilbi dermisesse. Alguses asub CR kahe jäsemepunga vahel ning hiljem laieneb ta anterio-posterioorselt ja moodustab seljakilbi külgmised osad. Valli moodustab ektodermi paksenemine ja all paikneva mesenhüümi kondenseerumine: protsess, mis on omane epiteel-mesenhüüm interaktsioonidele (Gilbert *et al.*, 2001). FGF (fibroblasti kasvufaktorite) signaalid seljakilbi dorsolateraalses dermises säilitavad CRi mõlemas embrüo pooles ja suunavad migreeruvate roiete eellaskke seljakilbi dermisesse. Arenevad roided eritavad luu morfogeneetilisi valke (BMP), mis algatavad intramembraanse luu moodustumise ümbritsevas dermises (Cebra-Thomas *et al.*, 2005).

Kõigil kilpkonnadel on kümme seljakilbiga seonduvat rindkere selgrootüli (rinnalüli) ning igal lülil on ühepealine roie, mis tihti liigendub sellest anterioorse selgrootüliga. Kilp sisaldab endas endokondraalseid kere toeselemente, mida katavad dermaalsed luud ja välimine β -keratiini kilbistest (*scutes*) koosnev epidermaalne kiht (Gilbert *et al.*, 2001; Alibardi ja Thompson, 1999a). Kilpkonna kasvades tuleb kilbiste alla keratiini kihte juurde (Hickman *et al.*, 2006). Iga kilbis katab konkreetset luupealset ala, aga kilbiste ja luu muster pole üksüheses vastavuses. Epidermaalne kilbise muster areneb enne kilbi lubjastumist ja all paiknev dermis on vajalik kilbiste moodustumiseks (Gilbert *et al.*, 2001).

1.2 Epiteel-mesenhüüm interaktsioonid naha tekiste arengus

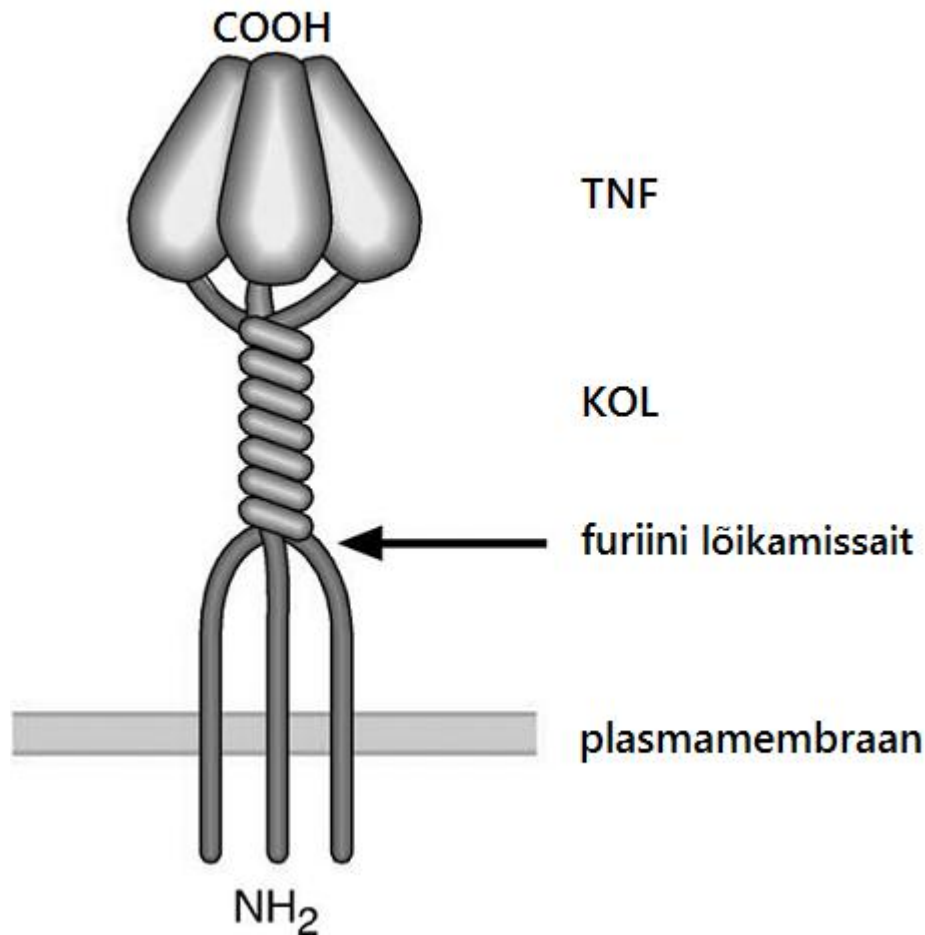
Nahk koosneb ektodermaalset päritolu epidermi koest ehk välimisest epidermist ja mesodermaalset päritolu mesehüümi koest ehk dermisest. Epidermaalses plakoodis eritatakse valke, mis annavad all paiknevale dermisele märku kondenseerumiseks, ja dermaalne mesenhüüm vastab, eritades faktoreid, mis määravad naha tekiste olemuse, sealhulgas arenemise sulgedeks, küünisteks või soomusteks (Gilbert, 2014). Epidermaalsete naha tekiste areng algab ektodermaalse plakoodi ilmunisest ehk epiteeli paksenemisest, millega kaasneb plakoodi all paiknevate mesenhüümiliste rakkude tihenemine (Pispa ja Thesleff, 2003).

Epiteeli ja mesenhüümi vahelist suhtlust vahendavad mitu signaalmolekulide perekonda: Wnt, FGF, transformeerivad kasvufaktorid β (TGF- β) ja sonic hedgehog (Shh) (Pispa ja Thesleff, 2003). Viimase aastakümne jooksul on avastatud TNF perekonna ligandi ektodüsplasiin (Eda) oluline roll epiteeli tekiste morfogeneesis initsiatsioonist diferentseerumiseni (Mikkola, 2008).

1.3 Ektodüsplasiin

1.3.1 Eda ja Eda-A1-Edar signaalrada

Ektodüsplasiin-A (Eda) on kasvaja nekroosifaktori (TNF) perekonda kuuluv ligi neljasajast aminohappest koosnev transmembraanne valk, millel on lühikesed kollageeni sarnased glütsiini kordused (joonis 1). Eda korraldab ekstratsellulaarse maatriksi adhesiooni (Mikkola *et al.*, 1999). Inimesel on *EDA* geen X-liiteline (Xq12-q13,1; pikkus 423 Kbp) ning kodeerib kahte isovormi, Eda-A1 ja Eda-A2 (Häärä, 2013). Ektodüsplasiini esimene isovorm Eda-A1 aktiveerib oma retseptori Edari, teine isovorm Eda-A2 seondub aga retseptori Xedariga, kusjuures isovormid erinevad ainult kahe aminohappe poolest, sest nad on retseptor-spetsiifilised (Yan *et al.*, 2000). Mõlemad isovormid osalevad epidermaalses morfogeneesis (Yan *et al.*, 2000), kuid tõsiasi, et *Eda* *-/-* (puuduvad kõik isovormid), *Edar* *-/-* ja *Edaradd* *-/-* hiirtel on kõigil ühesugused fenotüübid (puuduvad või ebanormaalsed hambad, vähesed või puuduvad karvad, hálbed näärmete arengus (Mikkola ja Thesleff, 2003)) viitab sellele, et Eda-A2 isovorm on arengus vähem tähtis (Mikkola, 2008).

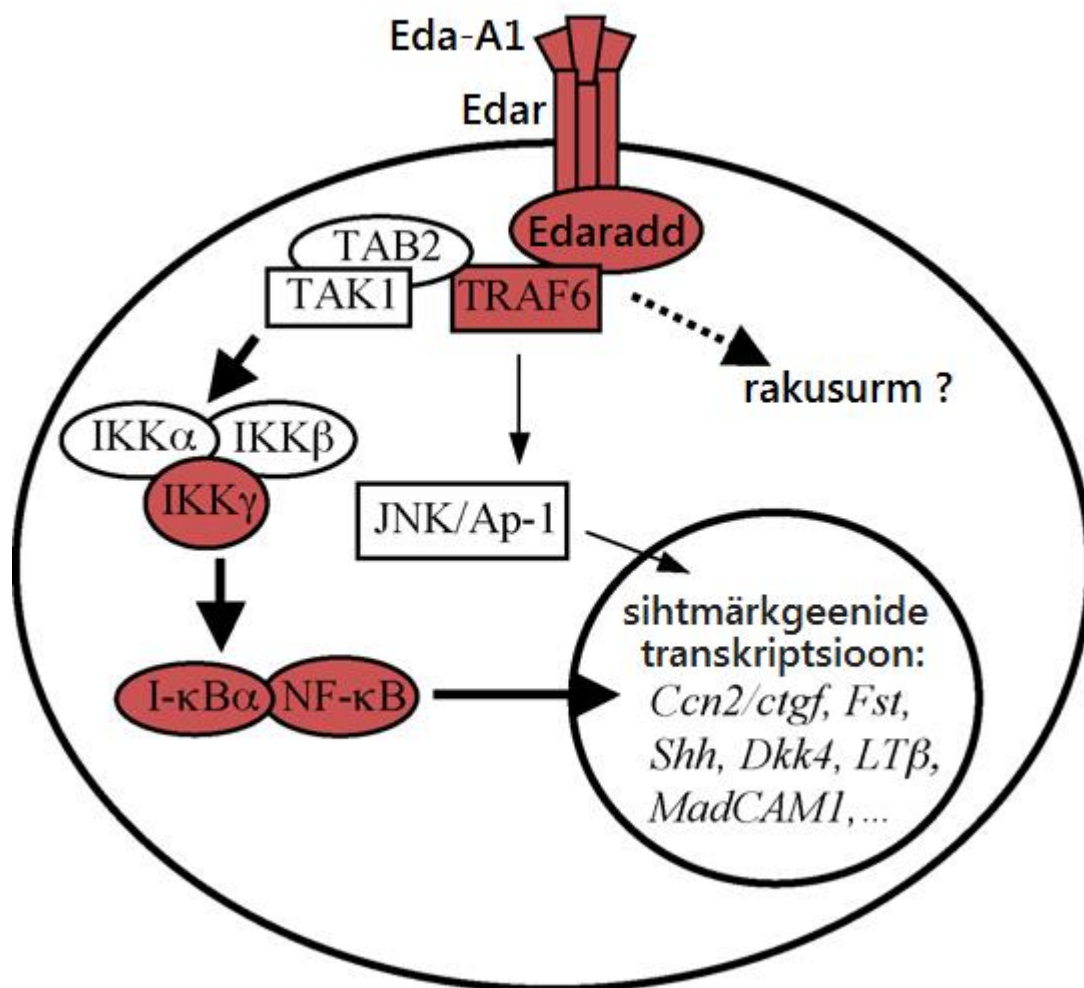


Joonis 1. Ektodüsplasiini ehitus. Ektodüsplasiini N-terminaalne osa paikneb raku sees. Ekstratsellulaarne osa koosneb TNF ligandi domäänist (TNF), furiini lõikamissaidist ja kollageeni sarnasest domäänist (KOL) (Pispa, 2004 põhjal).

Eda-A1-Edar signaalrada (edaspidi Eda signaalrada), mis koosneb Edast, Edarist ja tsütoplasmas olevast Eda retseptor-seostunud surma domäänist Edaradd (*Edar-associated death domain*) (Mikkola, 2008), on vajalik naha tekiste moodustumiseks nii hiirel, inimesel kui kalal (Harris *et al.*, 2008). Eda signaalrada on integreerunud Wnt ja aktiviini signaalradadega, mis viitab TNF perekonna valkude funktsioonile epiteel-mesenhüüm interaktsioonides (Laurikkala *et al.*, 2002).

Eda signaalrada algab Eda-A1 kinnitumisega oma retseptorile Edar, mis seondub adaptervalgule Edaradd (seondumist vahendavad mõlema valgu surma domäänid). Edaradd vahendab Edari seondumist järgnevate signaalraja molekulidega, ühendades Edari TNF retseptor-seonduvate faktoritega (Traf), milleks *in vivo* on peamiselt Traf6 (Naito *et al.*, 2002). Edaradd valgu surma domäänile isoleerisid Morlon *et al.* (2005) seondumiskaaslaseks adaptervalgu Tab2 (Tak1-siduva

valgu 2), mis seob Traf6 ja Tak1 (TGF β -aktiveeritud kinaas 1), aktiveerides seeläbi Tak1 ja sellele järgneva IKK (IkB kinaas) kompleksi (Morlon *et al.*, 2005). IKK kompleks, mis koosneb kahest kinaasi ühikust IKK1/ α ja IKK1/ β ning regulaatorsest koostisosast IKK/ γ ehk NEMO, viib IkB fosforüülimiseni. Ta algatab iseenda lagunemise ja vabastab transkriptsioonifaktori NF- κ B (Mikkola, 2008; joonis 2).



Joonis 2. Ektodüsplasiini signaalrada (Mikkola, 2008 põhjal).

Kuigi Eda signaalrada pole esimene plakoodi moodustumist algatav signaal, on ta üks esimesi plakoodi rakkude saatust reguleerivaid molekule (Mustonen *et al.*, 2004). Mutatsioonid Eda signaalrajas põhjustavad anhidrootilist või hüpoanidrootilist ektodermaalset düsplaasiat (HED) nii inimesel (Kere *et al.*, 1996) kui homoloogilisi defekte hiirel (Ferguson *et al.*, 1997; Srivastava *et al.*, 1997) ning sebrakalal (Harris *et al.*, 2008). Hiire ja inimeses reguleerib signaalrada karvade, hammaste, higi-, piima- ja süljenäärmete ning mitmete väiksemate näärmete arengut suu, nina ja

neelualas (Pispa, 2004) ja sebrakalal uimede, soomuste, hammaste, lõpusepiide ja kolju arengut (Harris *et al.*, 2008).

1.3.2 Eda signaalrada inimeses

1.3.2.1 Ektodermaalne düsplaasia

1875. aastal kirjutas Charles Darwin hindu perekonnast, kellel võis täheldada (nelja põlvkonna vältel ja ainult meestel) lõike- ja purihammaste ning juuste vähesust ja kuumarabanduse ohtu, kusjuures terved tütreid andsid haiguse edasi ainult poegadele (Darwin, 1875). Häire, millele ta viitas, on nüüdseks nimeks saanud anhidrootiline või hüpohidrootiline ektodermaalne düsplaasia (HED), ligikaudu kahesajast (Freire-Maia *et al.*, 2001) pärilikust ektodermaalsest düsplaasiast üks tavalisemaid. HED sündroomi põhjustavad mutatsioonid *EDA* geenis ning sellele on iseloomulik hammaste ja kehakarvade vähesus (vastavalt hüpodontia ja hüpotrihhoos) ning vähenenud võime higistada (hüpohidroos). HED sündroomiga isikud nakatuvad sagedamini bronhiiti (tõenäoliselt limanäärmete vähesuse tõttu) ning higinäärmete puudulikkuse pärast on oht ülekuumenemiseks, mis võib osutuda eluohtlikuks ja tekitada ajukahjustuse. *EDA* geeni põhjustatud HED (Kere *et al.*, 1996) ning *EDAR* ja *EDARADD* mutatsioonidest põhjustatud autosoomne retsessiivne ja autosoomne dominantne ektodermaalne düsplaasia (Monreal *et al.*, 1999; Headon *et al.*, 2001) on fenotüübilt omavahel eristamatud (Mikkola ja Thesleff, 2003).

1.3.2.2 *EDA* ekspressioon inimeses

EDA ekspressiooni on esimesena võimalik täheldada inimese embrüo 8. nädalal alalõua epidermises. Nädal hiljem näitavad ekspressiooni areneva jäsme epidermis ning 10. nädalal on täheldatav ekspressioon sõrmede, kuulmiskanali, kolju ning üla- ja alalõua epidermises ning alates 16. nädalast embrüo kere epidermises. *EDA* ekspresseerub juuste karvafolliikulites alates 18. nädalast ning täiskasvanuna lisaks karvafolliikulitele ka eesnäärmes, piima-, higi- ja rasunäärmetes ning hammastes (Montonen *et al.*, 1998).

Inimesel ekspresseerub ektodüsplasiin teisteski kohtades peale nende, kus Eda signaalraja mutatsioonidest tingitud arenguhäireid on kirjeldatud. Alates 8. nädalast ekspresseerub *EDA* loote aju vesiikuleid ja lülisambakanalit ümbritsevates neuroepiteeli rakkudes, 10. nädalast spinaalganglionides ja seljaaju eesmise sarves. Täiskasvanul on *EDA* ekspressioon täheldatav sümpaatilistes ganglionides, spinaalganglionides ja hüpotaalamuses (Montonen *et al.*, 1998).

EDA ekspressioon on näha 8-nädalase embrüo arenevas südames ja neli nädalat hiljem tüümuses. 12-nädalases embrüos on täheldatav *EDA* tugev ekspressioon roiete ning 16. nädalal kolju anterioorsete luude osteoblastides. Söögitoru epiteelis on *EDA* ekspressiooni täheldatud alates embrüo 12. nädalast, vaagna epiteelis ning neeru kogumistorukestes alates 20. nädalast (Montonen *et al.*, 1998).

1.3.3 Eda signaalrada hiires

1.3.3.1 Eda signaalraja mutatsioonidest põhjustatud defektid

1952. aastal isoleeris Falconer spontaanse hiire mutatsiooni *Tabby* (*Ta*), kelle fenotüüp erines *wt* (*wild-type*) hiirest karvade, hammaste ja näärmete poolest—kolm naha tekist, mis antud fenotüübil arenesid kas ebanormaalseiks, liiga väikesteks (vähesteks) või puudusid täielikult (Grüneberg, 1965). *Ta* geen on homoloogne inimese *EDA* geeniga (Srivastava, 1997). Epiteelsed organid, mille fenotüüp *Ta* hiirel erineb *wt* hiirest, arenevad ektodermist ja selle all paiknevast mesenhüümi koest (Pispa *et al.*, 1999). Defektid ektodüsplasiini ekstratsellulaarses kollageenses domäänis võivad olla *Ta* mutandi ning HED fenotüübi aluseks ning tõenäoliselt on antud domään tähtis epiteel-mesenhüüm vastastikmõjus (Ferguson *et al.*, 1997).

Ta hiire fenotüübile sarnaneb *downless* (*dl*) mutant (defektid karvafolliikulite arengus, väärarenenud hambad ja puudulikud higinäärmed), kuid seda põhjustav geen kodeerib mitte Edat, vaid tema retseptorit Edar (Headon ja Overbeek, 1999). Homoloogne HED fenotüüp on ka *crinkled* (*cr*) mutandil ning sel puhul on vigane *EDARADD* geen (Headon *et al.*, 2001). Lisaks üksikasjalikult uuritud naha tekiste puudulikkusele põhjustavad mutatsioonid Eda signaalrajas ka defekte saba lülide (Hill *et al.*, 2002) ja alalõualuu (Bornert *et al.*, 2011) morfoloogias, mis, arvestades asjaolu, et Eda ekspresseerub inimese loote osteoblastides, annab aluse arvata, et *EDA* geen on vajalik ka luu normaalseks arenguks (Hill *et al.*, 2002).

1.3.3.2 Eda ekspressioon hiires

Nagu inimeselgi ekspresseerub hiirel *Eda* kohades, mida ektodermaalne düsplaasia (teadaolevalt) ei kahjusta: mitmetes areneva aju epiteelsetes osades (Pispa *et al.*, 2003), mõnel pool kolju mesenhüümis ja pisaranäärmete epiteelis. Tähelepanuväärne on *Eda* ekspressioon submandibulaarset süljenääret ümbritsevas mesenhüümis, sest samaaegselt ekspresseerub Edar epiteelses süljenäärmes ning eelmainitud ekspressioonimuster kinnitab Eda signaalraja toimumist

epiteeli ja mesenhüümi vahel. E10 hiire jäsemepungas *Eda* ekspressiooni ei täheldatud, aga see võib tuleneda ka *Eda* ekspressiooni vähesusest (Pispa, 2004).

1.3.4 *Eda* signaalraja mutatsioonidest tingitud defektid sebrakalas (*Danio rerio*)

Kuigi ektodüsplasiini ega tema retseptorit pole sebrakala embrüonaalseks arenguks vaja, on mõlemad hiljem vajalikud soomuste, kolju, uimede ja hammaste normaalseks väljakujunemiseks. *Eda* signalisatsiooniraja mutatsioonidest tingitud sarnased fenotüübimuutused on tingitud sellest, et imetaja karvade ja kala soomuste varajane arenguetapp on evolutsioonis konserveerunud (Harris *et al.*, 2008).

Sebrakalade mutandid, kelles ilmnevad *Eda* signaalrajas toimunud mutatsioonidest tingitud defektid, jagunevad kaheks komplementaarseks grupiks. Esimesse kuuluvad *finless* mutandid, kellest esimese, uimede puudulikkusega fls^{te370f} alleeli isoleerisid Haffter *et al.* (1996). Kaks järgnevat, dominantse fls^{dt3Tpl} (*Topless* alleeli) ja hammaste fenotüüpi mõjutava fls^{tfang} (*fang* alleeli) isoleerisid Harris *et al.* (2008). Dermaalse skeleti struktuuride kaotust fls^{te370f} alleelil kirjeldab uimekiirte, soomuste, neeluhammaste ja lõpusepiide väiksem arv ning muutunud kolju kuju. *Topless* alleelil fls^{dt3Tpl} pole uimede areng muutunud, kuid vähenenud on lõpusepiide, hammaste ja soomuste arv ning muutunud soomuste korrapära. *Fang* alleeli fls^{tfang} mõju uimede arengule pole täheldatud, küll aga puuduvad tal osaliselt hambad, lõpusepiid ja soomused (Harris *et al.*, 2008).

Teine grupp hõlmab ainsat alleeli *Nackt* (*Nkt*), mis on dominantne ning põhjustab vigu soomuste kujus ja mustris nii homosügootses kui heterosügootses seisus. *Nkt* homosügootidel puuduvad soomused, hambad ja lõpusepiid ning kalad sarnanevad *fls* fenotüübiga, kuid heterosügootsetel *Nkt* mutantidel on muster vigane ja puuduvad vaid osad soomused, kusjuures uimede areng on tavapärane. Sebrakalade *finless* ja *Nackt* mutantide arengus ilmnevad vead osutavad ektodüsplasiini olulisusele sebrakala soomuste, uimede, hammaste, lõpusepiide ja kolju väljakujunemises (Harris *et al.*, 2008).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

- Kirjeldada *Eda* ja *Edari* ekspressiooni punakõrv-ilukilpkonna *T. scripta* arengus;
- Võrrelda *Eda* ekspressiooni kilpkonnas kirjanduses näidatud *Eda* ekspressiooniga teistes selgroogsetes.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Kasutatud punakõrv-ilukilpkonnade embrüod

Kasutatud punakõrv-ilukilpkonnade embrüod on saadud USAst professor Scott F. Gilberti kaudu. Kilpkonnade staadiumid on määratud Greenbaumi järgi (Greenbaum, 2002).

2.2.2. Plasmiidi paljundamine

Dr Ritva Rice poolt kloneeritud kilpkonna *Eda* cDNA fragmendiga plasmiid transformeeriti *Escherichia coli* Nova XG tüve bakterirakkudesse, mis olid töödeldud CaCl_2 ga. 50 µl bakterirakke koos 10 µl ligeerimisseguga hoiti 30 min jääl, 3 min 37 °C juures termostaadil ning külmašoki jaoks taas paar min jääl. Lisati 1 ml ampitsilliiniga LB (Luria-Bertani) söödet ning lasti seista 1 h 37 °C juures. Ajal, mil rakud inkubeerusid, valmistati ette söötme plaadid: mõlema plaadi kohta segati kokku 100 µl LBd, 25 µl (20 µg/ml) X-Gali ja 2 µl 500 mM IPTGd. Enne külvamist pandi plaadid 37 °C juurde. Rakud tsentrifuugiti tuubi põhja 3 min 6 000 rpm (relatiivne tsentrifugaaljõud) juures. Supernatant eemaldati nii, et 100 µl rakke jäi alles, seejärel rakud suspendeeriti ning plaaditi Amp-sisaldavale tassile, mida inkubeeriti üleöö 37 °C juures. Järgmisel päeval tõsteti mõlemast petri tassist 1 koloonia 100 ml LB vedelsöötmesse, mis sisaldas 350 mg ampitsilliini.

2.2.3. Plasmiidi eraldamine bakterist

E. coli Nova XG bakteritest eraldati plasmiid Qiagen Plus Maxi Kit protokoll järgides.

2.2.4 DIG-märgistatud RNA proovide süntees

Eda ja *Edar antisense* RNA proove sünteesiti mahus 20 µl. *In vitro* transkriptsiooniks kasutati 2 µl 10 x transkriptsioonipuhvrit (Roche), 2 µl 10 x DIG-märgistatud nukleotiidide segu (Roche), 2

µl RNA polümeraasi, 0,5 µl RNAasi inhibiitorit Ribolock RNA Inhibitor (Fermentas) ja 1 µg lineariseeritud plasmidi. *Antisense* ahela sünteesimiseks kasutati RNA polümeraasi SP6. Transkriptsioon toimus 2 h 37 °C juures ning kontrolliti geelelektroforeesil. Vabanemaks plasmiidsest DNAST lisati lahusesse 1 µl RNAasi-vaba DNase I (1 U/µl; Thermo Scientific) ja inkubeeriti lahust 15 min 37 °C juures. RNA sadestamiseks kasutati 10 µl 4 M LiCl, 300 µl 96% etanooli, 100 µl mQ ja 18 µl proovi ning hoiti üleöö -20 °C juures. Järgneval päeval tsentrifuugiti sadestunud RNA põhja 20 min 13 000 p/min (kasutades Eppendorf Biofuge Pico rootorit 3324) ning pesti sadet 70% etanooliga. RNA proov lahustati 50% formamiidis ning RNA kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific). DIG-märgistatud RNA säilitati -20 °C juures.

2.2.5 Whole-mount embrüote mRNA *in situ* hübridisatsioon

2.2.5.1 Eeltöötlus

4% PFAs fikseeritud St 16 kilpkonna embrüoid pesti 5 min PBTga (1 x PBS, 0,1% Tween20) ja dehüdreeriti metanooliga PBTs (25%, 50%, 75%, 2 x 100%), igauht 5 min. Embrüod rehüdreeriti samade kontsentratsioonidega metanooliga vastupidises järjekorras ning pesti metanoolijääkide eemaldamiseks 2 x 5 min PBTga. Valkude lagundamiseks töödeldi embrüoid 10 min 10 µg/ml proteinaas K (Fermentas) lahusega PBSis. Proteinaas K toime lõpetati värskelt valmistatud 2 mg/ml glütsiini lahusega PBTs, kus embrüoid hoiti 5 min, pesti embrüoid 2 x 5 min PBTga ja fikseeriti uuesti 20 min 4% PFA lahusega, milles oli 0,2% glutaaraldehüüdi. Embrüoid pesti 2 x 5 min PBTga ning asetati hübridisatsioonisegusse (50% formamiidi, 5 x SSC (pH 5)). Kilpkonna embrüoid säilitati kasutamiseni hübridisatsioonisegus (50% formamiidi, 5 x SSC (pH5)) -20 °C juures.

2.2.5.2 Hübridisatsioon

Eelnevalt töödeldud kilpkonna embrüoid eelhübridiseeriti hübridisatsioonisegus (50% formamiidi, 5 x SSC, 1% SDS) loksutil 70 °C juures 1,5 h. Hübridisatsiooniks kuumutati RNA proove 5 min 80 °C juures ja jahutati koheselt jääl. Proovid segati hübridisatsiooniseguga kontsentratsioonis 1 µg/ml ja embrüod asetati segusse. Embrüod hübridiseerusid loksutil üleöö 70 °C juures.

2.2.5.3 Hübridisatsioonijärgsed pesud

Järgmisel päeval pesti embrüoid loksutil 65 °C juures 2 x 30 min lahuses, mis sisaldas 50% formamiidi, 5 x SSC (pH 5) ja 1% SDS. Järgnev lahus, milles embrüoid samuti 65 °C juures 2 x 30 min hoiti, sisaldas 50% formamiidi ja 2 x SSC. Seejärel pesti embrüoid 3 x 5 min 1 x TBSTga, mis sisaldas 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl ja 0,1% Tween20.

2.2.5.4 Immunohistokeemia, värvimine ja pildistamine

Embrüoid blokeeriti 1 h toatemperatuuril 2% BR (*Blocking Reagent*, Roche) 1 x TBSTs ning seejärel asetati embrüod lahusesse, mis sisaldas aluselise fosfataasiga konjugeeritud digoksygeniini vastast antikeha (Roche) vahekorras 1 : 2000 1% BR TBSTs ning hoiti üleöö 4 °C juures. Anti-DIG antikeha eemaldamiseks pesti embrüoid 3 x 5 min 1 x TBSTga, 2 h jooksul veel kolm korda ning jäeti üleöö TBSTsse 4 °C juurde. Järgneval päeval pesti embrüoid 3 x 10 min NTMTga (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 50 mM MgCl₂, 0,1% Tween20) ning värviti aluselise fosfataasi substraadiga (Roche *BM Purple AP Substrate*) kuni soovitud tulemuseni. Värvusreaktsioon peatati 1 x PBSiga ning embrüod järelfikseeriti 10 min 4% PFAGA. Embrüoid säilitati 1 x PBS lahuses 4 °C juures ning pildistati Olympus U-CMAD3 kaameraga, mis oli kinnitatud Olympus SZX12 mikroskoobi külge.

2.2.6 mRNA *in situ* hübridisatsioon parafiinilõikudel

2.2.6.1 Parafiini sisestamine ja parafiinilõikude valmistamine

Parafiini sisestamise ettevalmistamiseks dehüdreeriti embrüod etanooliga (55%, 65%, 75%, 85%, 95%, 2 x 100%). Embrüoid hoiti igas lahjenduses 4 °C juures 24 h.

Dehüdreeritud embrüoid hoiti parafiini sisestamisele eelnevalt 2 x 2 h ksüloolis. Järgnevalt paigutati embrüod üheks tunniks termostaati 65 °C juurde parafiini sisaldavasse vanni. Ksüoolijääkidest vabanemiseks tõsteti embrüod kolmeks tunniks parafiinivanni. Seejärel asetati embrüod glütserooliga määratud plastikust vormidesse ning sisestati sulanud parafiini, jahutati külmplaadil ning hoiti lõikamiseni 4 °C juures. Lõikamiseks kasutati parafiinmikrotoomi MICROM HM200. 8 µm paksused lõigud asetati alusklaasidele SuperFrost® Plus (Thermo Scientific). Koelõike hoiti üleöö kuumusel 37 °C juures ning säilitati edasise töötlemiseni 4 °C juures.

2.2.6.2 Eeltöötlus

In situ hübridisatsiooni alustamiseks kuumutati koelõikudega kaetud klaase pool tundi 60 °C plaadil. Seejärel hoiti neid 2 x 5 min ksüloolis ning rehüdreeriti koelõigud alaneva etanoolireaga (2 x 5 min 100%, 3 min: 96%, 70%, 50%). Pärast PBSiga loputamist hoiti klaase valkude lõhustamiseks 5 min 10 µg/ml proteinaas K-d sisaldavas PBSis. Järgnevalt pesti koelõike 5 min PBSiga ning fikseeriti 15 min 4% PFAGA PBSis. Klaase loputati Milli-Q vees ning inkubeeriti 10 min 100 mM trietanoolamiini lahuses (pH8), millele lisati magnetsegajaga segades 27 mM äädikhappe anhüdriidi. Koelõike pesti 5 min PBSiga, misjärel tasakaalustati soolade kontsentratsioonid 5 x SSCga (pH 5). Enne hübridisatsiooni eelhübridiseeriti klaase 65 °C juures parafilmi all üks tund ilma proovita hübridisatsioonisegus (50% formamiidi, 5 x SSC (pH 5) ja 2% BR (*Blocking Reagent*, Roche)).

2.2.6.3 Hübridisatsioon

RNA proovi kuumutati 5 min 80 °C juures, jahutati jääl ning segati hübridisatsiooniseguga (mis sisaldas 50% formamiidi, 5 x SSC (pH5), 2% BR, 10% dekstraansulfaati ja 1 x Denhardti lahust) kontsentratsioonis 2 µg/ml. RNA prooviga segu tilgutati lõikudele ja jäeti üleöö katteklaasi alla hübridisatsioonikambrisse 65 °C juurde.

2.2.6.4 Hübridisatsioonijärgsed pesud

Järgneval päeval pesti koelõike 30 min 65 °C juures eelsoojendatud lahusega, mis sisaldas 50% formamiidi, 5 x SSC (pH 5) ja 1% SDS, misjärel toimus 2 x 30 min pesu 50% formamiidi, 2 x SSC (pH 5) lahuses 60 °C juures. Koelõikudega klaase hoiti 3 x 15 min 1 x TBSTs.

2.2.6.5 Immunohistokeemia, värvimine ja pildistamine

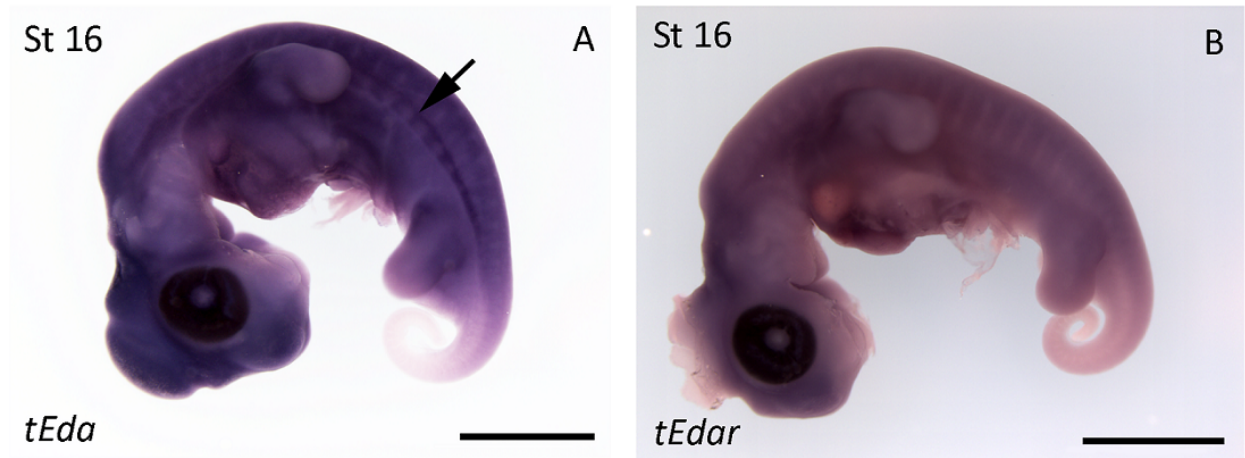
Koelõike blokeeriti tund aega toatemperatuuril 2% BRiga 1 x TBSTs, misjärel kanti klaasidele aluselise fosfataasiga konjugeeritud digoksygeeniini vastane antikeha (Roche) vahekorras 1 : 2000 1% BR 1 x TBSTs. Antikehaga inkubeeriti üleöö 4 °C juures. Järgmisel päeval pesti lõike toatemperatuuril 3 x 15 min 1 x TBSTga ja 2 x 10 min NTMTga (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 50 mM MgCl₂, 0,1% Tween20). Värvusreaktsiooni jaoks kasutati aluselise fosfataasi substraati (Roche *BM Purple AP Substrate*) ning lasti lõikudel värvuda pimedas toatemperatuuril. Lõikude piisaval värvumisel peatati reaktsioon PBSiga ja sulundati klaasid 80% glütserooli lahusega Milli-Qs. Koelõike pildistati Olympus DP71 kaameraga ning suurendus

saavutati Olympus BX51 mikroskoobiga. Kokku viidi *in situ* hübridisatsiooni koelõikudel läbi kaheksa korda.

2.3 Tulemused

2.3.1 *In situ* hübridisatsioon punakõrv-ilukilpkonnade embrüotel

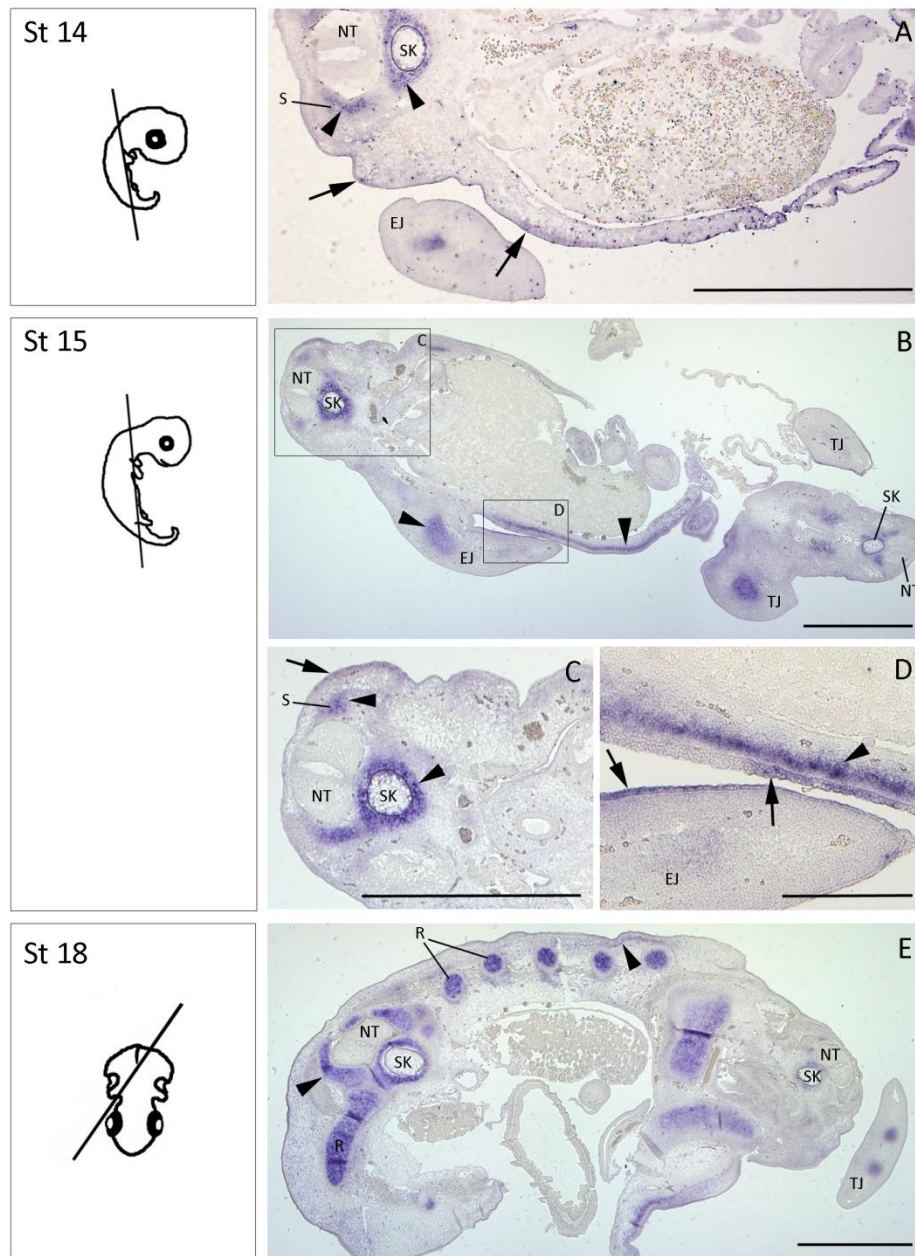
In situ hübridisatsioon punakõrv-ilukilpkonnade (St 16) embrüotega näitab *Eda* tugevat ekspressiooni võrreldes *Eda* retseptoriga (joonis 3), mis erinevatel allikatel (Laurikkala *et al.*, 2002; Pispala *et al.*, 2003) on väga nõrk ning tõenäoliselt vajab edasiuurimiseks radioaktiivse *in situ* hübridisatsiooni läbiviimist. Sellest lähtuvalt oli loogiline jätkata *Eda* ekspressiooni uurimisega parafiinilõikudel, et seda üksikasjalikumalt kirjeldada.



Joonis 3. mRNA *in situ* hübridisatsioon: Ektodüsplasiini (A) ja tema retseptori (B) ekspressioon *T. scripta* embrüotes (St 16). (A) Noolega on näidatud *Eda* ekspressioon roiete ja seljakeeliku piirkonnas. Esijäsemest posterioorses suunas lähtuv kitsas ekspressioonipiirkond võib tähistada CR asukohta keha küljel. (B) *Edar* spetsiifilist hübridisatsioonisignaali pole võimalik eristada. Mõõtkava 2 mm.

2.3.2 *In situ* hübridisatsioon parafiinilõikudel

Pärast seda, kui sai kinnitust *Eda* ekspressioon punakõrv-ilukilpkonnas (joonis 3), jätkati hübridisatsiooniga parafiinilõikudel, et ekspressiooni üksikasjalikumalt näha. Katseid viidi läbi 14., 15. ja 18. staadiumis olevate punakõrv-ilukilpkonnade lõikudega (frontaaltasapinnas 14. ja 15. staadiumis ning viltuses sagitaaltasapinnas 18. staadiumis olevate embrüotega).



Joonis 4. mRNA *in situ* hübridisatsioon: Ektodüsplasiini ekspressioon *T. scripta* koelõikudel (st 14, st 15 ja st 18). Sabaga nooled tähistavad ekspressiooni ektodermaalset ja sabata noolede mesodermaalset päritolu kudedes. (A) St 14 frontaallõigul on näha *Eda* ekspressioon kehaseina epiteelis nii posterioorselt kui anterioorselt jäsme suhtes (sabaga nooled) ja mesenhümaalne ekspressioon notokordi ehk seljakeeliku (SK) ümber (sabata nool), neuraaltoru (NT) külgedel somiitides (S; sabata nool) ning esijäsme (EJ) proksimaalses osas. (B) St 15 ekspresseerub *Eda* samades kohtades, kuid üksikasjalikumalt on võimalik vaadelda (C) mesenhümaalset *Eda* ekspressiooni SK ümber ja NT külgedel olevates somiitides (sabata nooled) ning nendest lateraalselt ektodermis (sabaga nool). Mesodermaalne ekspressioon on näha ka tagajäsme (TJ; pildil alumine) keskel. (D) *Eda* ekspresseerub epiteelsetes

kudedes ning märgatav on kudede mitmekihilisus (sabaga nooled). Tähelepanuväärne on *Eda* ekspressioon kehaseina epiteelis (parempoolne sabaga nool), sest sellest anterioorses epiteelis ekspressioon ei jätku (võib viidata kilbise arengule). Kõrval on näha *Eda* ekspressioon mesenhümaalset päritolu dermises (sabata nool). (**E**) St 18 on märkimisväärne *Eda* ekspressioon arenevas roides (R; vasakpoolne sabata nool), ristilõikes on näha viit roiet ja tagajäset. Mesenhümaalset ekspressiooni dorsaalses kehaseinas näitab parempoolne sabata nool. Lühendid: EJ – esijäse, NT – neuraaltoru, SK – seljakeelik, R – roie, TJ – tagajäse. (**A – C, E**) Mõõtkava 1 mm. (**D**) Mõõtkava 0,25 mm.

T. scripta embrüotes esineb *Eda* ekspressioon kõikides vaadeldud vanustes. St 14 on *Eda* ekspressioon nähtav nii epidermises kui tema all paiknevas mesenhüümis (joonis 4 A). St 15 on näha mesenhümaalne *Eda* ekspressioon lateraalses kehaseinas (joonis B, sabata nool keskel) ning selle suhtes distaalselt paiknev epidermaalne piiritletud *Eda* ekspressiooniga ala (joonis 4 B, D). St 18 on näha mesenhümaalne *Eda* ekspressioon posterioorses kehaseinas (joonis 4 E, parempoolne sabata nool). Tugev *Eda* ekspressioon esineb ka jäsme sisekülje epidermis (joonis 4 D). Neuraaltoru külgedel paiknevates mesodermaalset päritolu somiitide sklerotoomi piirkonnas on tugev *Eda* ekspressioon nähtav nii 14., 15. kui 18. staadiumi embrüote anterioorsel kehapoolel (joonis 4 A, B, C, E). Kõigis vaadeldud staadiumites ekspresseerub *Eda* eriti tugevalt seljakeeliku ümber koelõikude anterioorsel poolel, aga posterioorselt on seljakeeliku ümber ekspressioon nõrk (joonis 4 A, B, C, E). Neuraaltorus ekspressioon puudub. Kõikides vaadeldud vanustes on selgepiirilised mesodermaalsed ekspressioonipiirkonnad esi- ja tagajäsemetes (joonis 4 A, B, E).

2.4 Arutelu

Eda ekspressiooni uurides on siiani peamiselt keskendutud ektodermaalset päritolu organitele, sest *Eda* signaalraja mutatsioonidest tingitud defektid on paremini nähtavad naha tekistes, eriti karvade, näärmete ja hammaste morfoloogia muutustes nii inimesel kui hiirel (Kere *et al.*, 1996; Srivastava *et al.*, 1997; Laurikkala *et al.*, 2001). Homoloogsed *Eda* signaalraja mutatsioonid sebrakalas põhjustavad hammaste, uimede, soomuste, lõpusepiide ja kolju hälbelist arengut (Harris *et al.*, 2008). *Eda* ekspressiooni mesodermaalset päritolu organites on uuritud vähem kui ektodermaalsetes naha tekistes, kuid siiski on *Ta* fenotüübil täheldatavad vead saba lülides (Hill *et al.*, 2002) ja alalõualuus (Bornert *et al.*, 2011), mida võib seletada asjaolu, et ektodermaalset düsplaasiat ei peeta ainult üht lootelehte hõlmavaks sündroomiks—ta võib esineda koos nii mesodermaalsete kui endodermaalsete düsplaasiatega (Itin, 2009).

Ainsana roomajatest on vaadeldud *Eda* (ja *Edari*) ekspressiooni Ameerika alligaatori *Alligator mississippiensis* hamba embrüonaalses arengus (Weeks *et al.*, 2013), aga teadaolevalt *Eda* ekspressiooni kilpkonna embrüonaalses arengus varem kirjeldatud pole. Kilpkonnaliste seltsile iseloomulikud epidermaalsed naha tekised on kilbised, mis varases arengustaadiumis (St 15) on näha seljal paiknevate ebakorrapäraste kortsudena (Greenbaum, 2002). 14. ja 15. staadiumi dorsaalses epiteelis nähtud ebakorrapärane *Eda* ekspressioon võib viidata kilbiste arengule. Seljakilbi epidermaalses osas, kus kilbiste arenguks on olulised epiteel-mesenhüüm vastastikmõjud (Gilbert *et al.*, 2001), leitud *Eda* ekspressioon võib tähendada, et *Eda* signaalrada on oluline mitte ainult naha tekiste arengus imetajates ja hiirtes, vaid ka kilpkonna kilbi(st)e arengus.

Kindlapiirilise epidermaalne *Eda* ekspressioon oli näha 15. staadiumis *Edat* ekspresseeriva mesenhüümi kohal esijäseme taga kehaseinas. Arvatavasti paistis sama piirkond St 16 *whole-mount* hübridisatsiooniga värvitud embrüol tumedama jutina esi- ja tagajäseme vahel. Arvestades selle ekspressioonipiirkonna paiknemist, võib oletada, et tegu on CRiga. CR hakkab arenema Yntema 14. staadiumis, mis vastab Greenbaumi 14. staadiumile, ning täielikult on CR moodustunud 16. staadiumiks (Greenbaum, 2002). CR, mis moodustab kilpkonna kilbi külgmise serva, on äärmiselt sarnane jäsemepunga signaalkeskuse, apikaalse ektodermaalse valliga (Burke, 1989). Sarnasust kinnitab asjaolu, et Wnt signaalmolekulide perekonda kuuluv *Wnt5a* geen, mis ekspresseerub kilpkonna CR alas, ekspresseerub samal ajal esi- ja tagajäsemete pungades (Wang *et al.*, 2013). Ekspressioon mõlemas kohas viitab sellele, et CR arenguga seotud signaalrada on tõenäoliselt pärit jäsemepungast (Nagashima *et al.*, 2007; Kuraku *et al.*, 2005). Wnt signaalmolekulide olulisus naha tekistes (Pispa ja Thesleff, 2003) ning ekspressioon CRis (Wang *et al.*, 2013), annavad põhjuse oletada, et mainitud *Eda* ekspressioonipiirkond on tõepoolest CR. Kuna on teada CRi funktsioon roiete migratsiooni mõjutajana, oleks huvitav edasi uurida, kas ka *Eda* signaalrada omab rolli roiete migreerumisel dermisesse.

Epiteelset ekspressiooni võis täheldada ka esijäseme sisemisel küljel. *Eda* ekspressioon jäseme epiteelis võib tuleneda sellest, et areneva kilpkonna jäsemeid hakkavad katma soomused (mis on naha tekis, seega *Eda* ekspressioon on tõenäoline). Erinevalt kaladest, kelle soomused on dermaalset päritolu, on roomajate soomused peamiselt ektodermaalset päritolu (Hickman *et al.*, 2006).

Huvitava ekspressioonimustri pakub roiete suhteline lähedus embrüo dorsaalsele kehaseinale ja läbilõike migreeruvast roidest, kus on näha tugev *Eda* ekspressioon. Järeldust migreeruvast roidest kinnitab ka asjaolu, et roided liiguvad kilbi dermises 18.-19. staadiumis (Greenbaum, 2002). Teades, et roided sisaldavad osteoblaste (Alibardi ja Thompson, 1999b) ning et selgroogsete osteoblastides on täheldatud *Eda* ekspressiooni (Montonen *et al.*, 1998), on tõenäoline, et 18. staadiumis vaadeldud roietes oli näha *Eda* ekspressiooni osteoblastides. Sama võib oletada jäsemetes nähtud mesenhümaalse ekspressiooni kohta.

Teadaolevalt pole *Eda* ekspressiooni mesodermaalset päritolu notokordi e seljakeeliku ümber täheldatud, kuid käesolevas töös ekspresseerus *Eda* seljakeeliku ümber tugevalt nii 14., 15. kui 18. staadiumis (tõenäoliselt on tegemist tulevase kõhrkoega ja seega evolutsiooniliselt konserveerunud ekspressiooniga). Kuigi Pispala (2004) *Eda* ekspressiooni hiire jäsemes ei täheldanud, ekspresseerub *EDA* inimese embrüo jäsemes (ka sõrmedes) ning käesolevas töös kirjeldatava punakõrv-ilukilpkonna jäsemes nii epiteelis kui mesodermis (arvatavates osteoblastides).

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli kirjeldada *Eda* ja tema retseptori ekspressiooni punakõrv-ilukilpkonnas mRNA *in situ* hübridisatsiooni meetodikat kasutades ning võrrelda *Eda* ekspressiooni kilpkonnas teadaoleva *Eda* ekspressiooniga teistes selgroogsetes. Kuigi *Eda* ekspressiooni on suurel määral uuritud *Eda* signaalraja mutatsioonide kaudu naha tekistes, on *Eda* ekspressiooni täheldatud ka mesodermaalsetes kudedes.

Whole-mount mRNA *in situ* hübridisatsioon nii *Eda* kui *Eda* retseptori *Edari* RNA prooviga kinnitas *Eda* ekspressiooni punakõrv-ilukilpkonnas (St 16), kuid *Edari* ekspressiooni ei õnnestunud valitud meetodiga näha. See on tõenäoliselt põhjustatud tema vähesest ekspressioonist ning vajab üksikasjalikumaks uurimiseks radioaktiivse *in situ* hübridisatsiooni läbiviimist. *Eda* ekspressiooni täpsemaks väljaselgitamiseks kilpkonna embrüotes tehti mRNA *in situ* hübridisatsioon parafiinilõikudel 14., 15. ja 18. staadiumis. *Eda* ekspressioon oli täheldatav nii epidermaalset kui mesodermaalset päritolu kudedes.

***Eda* ekspressioon ektodermaalset päritolu kudedes:**

- 14. staadiumis oli *Eda* täheldatav lateraalse kehaseina epiteelis jäseme suhtes posterioorselt ja anterioorselt ning 15. staadiumis katkendlikult kehaseina epiteelis. See võib viidata kilbise plakoodide arengule. Imetajates ekspresseerub *Eda* ektodermaalsetes naha tekistes: karvades ja näärmetes, mis on kilpkonna kilbiste ja soomuste homoloogid, seega on *Eda* ekspresseerumine kilpkonna epidermises oodatav.
- 15. staadiumis paiknes *Eda* ekspressioon esijäseme taga kehaseina epiteelis kindlapiirilise laiguna *Edat* ekspresseeriva mesenhüümi suhtes distaalselt. 16. staadiumis paistis tervel embrüol selles piirkonnas esi- ja tagajäseme pungade vahel kulgev kitsas *Eda* ekspressioonipiirkond. Tegu võib olla karapaksi valliga (CR), arvestades piirkonna asukohta ja asjaolu, et nii CR arengus kui *Eda* signalisatsiooni käigus on näidatud samade signaaliradade (Wnt signaalirada) toimimist.
- 15. staadiumis ekspresseerus *Eda* jäseme sisekülje epidermis. Ekspressiooni jäseme epidermis on näidatud inimese 9-nädalases lootes. Tõenäoliselt oli ekspressioon kilpkonna jäseme epidermis seotud naha tekiste arenguga (homoloogne inimese naha tekistega).

***Eda* ekspressioon mesodermaalset päritolu kudedes:**

- 14., 15. ja 18. staadiumis ekspresseerus *Eda* tugevalt anterioorse kehapoole seljakeeliku ümber, samuti oli kõigis vaadeldud staadiumites ekspressioon täheldatav neuraaltoru suhtes lateraalselt paiknevates somiitides (suure tõenäosusega on mõlema ekspressiooni puhul tegemist tulevase kõhrkoega).
- 15. staadiumi lateraalses kehaseinas (kilbi ääres) ekspresseerus *Eda* ühtlaselt kondenseeruv mesenhüüm, mis võib tähendada, et epiteel-mesenhüüm interaktsioonid ning *Eda* signaalrada selles on tähtsad kilbi moodustumiseks.
- Kõikides vaadeldud staadiumites esines *Eda* ekspressioon jäsemete mesenhümaalses koes. Arvestades, et inimeses on täheldatud *Eda* ekspressiooni osteoblastides, võib arvata, et *Eda* ekspresseerivad piirkonnad olid jäsemeluude alged.
- 18. staadiumis oli *Eda* ekspressioon nähtav arenevates roietes. *Eda* ekspressiooni olemasolu on näidatud ka inimese loote roietes, järelikult võib *Eda* signalisatsioonil olla roll luude arengus. *Eda* signaalraja mutatsioonidest põhjustatud defektid hiire luudes viitavad samuti *Eda* (signaalraja) olulisusele luu arengus.

Ectodysplasin Expression in the Development of the Red-Eared Slider Turtle *Trachemys scripta*

Anni Rebane

SUMMARY

Turtles (the order *Chelonia*) are reptiles whose evolutionary novelty is a shell which comprises a dorsal carapace and a ventral plastron. Forming of the carapace is launched by a lateral protrusion called the carapacial ridge (CR) that consists of dermal mesoderm and dorsal ectoderm. CR functions as a tool of entrapment for the ribs so that they would be unable to enclose the thorax, resulting in a dorsal carapace characteristic of turtles.

Ectodysplasin (Eda), a member of the tumor necrosis factor (TNF) family, has an isoform Eda-A1 which is part of the Eda-A1-Edar pathway, the purpose of which is to (eventually) trigger the canonical NF- κ B signaling pathway. Eda-A1-Edar pathway appears to be conserved across vertebrates, and mutations in said pathway result in ectodermal dysplasias which cause defects in mammals as well as fish, birds and amphibians. The ectodermal nature of those malformations in skin appendages (with the exception of bone defects in mice) has resulted in numerous studies focusing on the ectodermal expression of Eda. However, there are reports of mesenchymal Eda expression in humans, mice, and fish.

To the best of our knowledge, no Eda expression has been shown in turtles thus far. In this study, whole-mount mRNA *in situ* hybridisation as well as mRNA *in situ* hybridisation on slides is used in order to describe Eda expression in the red-eared slider *Trachemys scripta* and draw comparisons to other vertebrates in which Eda expression has been shown. Embryo stages 14, 15 (frontal planes) and 18 (tilted sagittal plane) slides were used and stages were determined according to Greenbaum (2002).

In situ hybridisation on slides showed epidermal Eda expression in all aforementioned stages, the most notable of which is St 14 and St 15 Eda expression in the body wall epithelium proximal to the forelimb. In St 15, the disrupted expression in the epithelium could refer to the formation of an epidermal scute, which might mean Eda expression is necessary for its normal development. Eda expression is also seen in anterior body wall epithelium and (discontinuously) in the forelimb.

Mesodermal Eda expression was noted as well, with expression around the notochord and in somites in all observed stages (which is likely to be a conserved expression in evolution). St 14 and St 15 showed Eda expression in the limbs and St 18 in the (migrating) rib osteoblasts. The lateral body wall mesenchyme of St 15 expressed Eda almost evenly, causing us to believe that Eda signalling pathway is important for the development of parts of the shell (and CR).

The expression of Eda in some tissues (like osteoblasts) was to be expected due to its expression in mice and human embryo. Likewise, Eda expression in skin appendages (supposed scute and scales) is characteristic of turtles and comparable to its expression in mammal, amphibian, avian and fish skin appendage development.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada Kersti Lillevälja ja Triin Tekkot aruka juhendamise, põneva teema ja sujuva koostöö eest ajal, mil katseid sai läbi viia kolmes hoones. Lisaks tahan tänada laborikollektiive nii Biomeedikumis kui TUMRIs ääretu abivalmiduse eest ning oma vendi ja vanemaid väärt nõuannete eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Alibardi, L., Thompson, M. B. 1999a. Epidermal differentiation during carapace and plastron formation in the embryonic turtle *Emydura macquarii*. *J. Anat.* 194: 531-545.
- Alibardi, L., and Thompson, M. B. 1999b. Morphogenesis of shell and scutes in the turtle *Emydura macquarii*. *Austral. J. Zool.* 47: 245-260.
- Bornert F., Choquet P., Gros C. I., Aubertin G., Perrin-Schmitt F., Clauss F., Lesot H., Constantinesco A., Schmittbuhl M. (2011). Subtle morphological changes in the mandible of Tabby mice revealed by micro-CT imaging and elliptical Fourier quantification. *Front. Physiol.* 2: 15.
- Burke, A. Development of the turtle carapace: implications for the evolution of a novel bauplan. (1989). *J. Morphol.* 199: 363-378.
- Cebra-Thomas, J., Tan, F., Sistla, S., Estes, E., Bender, G., Kim, C., Riccio, P., Gilbert, S. F. (2005). How the turtle forms its shell: a paracrine hypothesis of carapace formation. *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol.* 304B: 558-569.
- Ferguson, B. M., Brockdorff, N., Formstone, E., Ngyuen, T., Kronmiller, J. E., and Zonana, J. (1997). Cloning of Tabby, the murine homolog of the human EDA gene—Evidence for a membrane-associated protein with a short collagenous domain. *Hum. Mol. Genet.* 6: 1589-1594.
- Freire-Maia, N., Lisboa-Costa, T., Pagnan, N. A. B. (2001). Ectodermal dysplasia: How many? *Am. J. Med. Genet.* 104: 84.
- Gilbert, S. F., Loredó, G. A., Bruckman, A., Burke, A. C. (2001). Morphogenesis of the turtle shell: The development of a novel structure in tetrapod evolution. *Evol. Dev.* 3: 47-58.
- Greenbaum, E. (2002). A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys scripta*. *Can. J. Zool.* 80: 1350-1370
- Grüneberg, H. (1965). Genes and genotypes affecting the teeth of the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 14: 137-159.

- Haffter P., Odenthal J., Mullins M. C., Lin S., Farrell M. J., *et al.* (1996). Mutations affecting pigmentation and shape of the adult zebrafish. *Dev. Genes. Evol.* 206: 260-276.
- Harris, M. P., Rohner, N., Schwarz, H., Perathoner, S., Konstantinidis, P., *et al.* (2008). Zebrafish *eda* and *edar* Mutants Reveal Conserved and Ancestral Roles of Ectodysplasin Signaling in Vertebrates. *PLoS. Genet.* 4: 1-15.
- Headon, D. J., Emmal, S. A., Ferguson, B. M., *et al.* (2001). Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development. *Nature.* 414: 913-916.
- Headon, D. J., Overbeek, P. A. (1999). Involvement of a novel TNF receptor homologue in hair follicle induction. *Nat. Genet.* 22: 370-374.
- Hill, N. L., Laib, A., and Duncan, M. K. (2002). Mutation of the ectodysplasin-A gene results in bone defects in mice. *J. Comp. Pathol.* 126: 220-225.
- Häärä, O. (2013). Integration of *Eda* signaling with other signaling pathways in oral ectodermal organogenesis. Academic dissertation. University of Helsinki. 1-73.
- Itin, P. H. (2009). Rationale and back-ground as basis for a new classification of the ectodermal dysplasias. *Am. J. Med. Genet. A* 149: 1973-1976.
- Kere, J., Srivastava, A. K., Montonen, O. (1996). X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. *Nat. Genet.* 13: 409-16.
- Kuraku, S., Usuda, R., Kuratani, S. (2005). Comprehensive survey of carapacial ridge-specific genes in turtle implies co-option of some regulatory genes in carapace evolution. *Evol. Dev.* 7: 3-17.
- Laurikkala, J., Mikkola, M., Mustonen, T., Åberg, T., Koppinen, P., Pispa, J., Nieminen, P., Galceran, J., Grosschedl, R. and Thesleff, I. (2001). TNF signaling via the ligand-receptor pair ectodysplasin and *edar* controls the function of epithelial signaling centers and is regulated by Wnt and activin during tooth organogenesis. *Dev. Biol.* 229: 443-455.
- Laurikkala, J., Pispa, J., Jung, H. S., Nieminen, P., Mikkola, M., Wang, X., *et al.* (2002). Regulation of hair follicle development by the TNF signal ectodysplasin and its receptor *Edar*. *Development.* 129: 2541-53.

- Lyson, T. R., Joyce, W. G. (2012). Evolution of the turtle bauplan: the topological relationship of scapula relative to the ribcage. *Biol. Lett.* 8: 1028-1031.
- Mikkola, M. L. (2008). TNF superfamily in skin appendage development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19: 219-230
- Mikkola, M. L., Pispä, J., Pekkanen, M., Paulin, L., Nieminen, P., Kere, J., and Thesleff, I. (1999). Ectodysplasin, a protein required for epithelial morphogenesis, is a novel TNF homologue and promotes cell-matrix adhesion. *Mech. Dev.* 88: 133-146.
- Mikkola, M. L., Thesleff, I. Ectodysplasin signalling in development. (2003). *Cytokine Growth Factor Rev.* 14: 211-224.
- Monreal, A. W., Ferguson, B. M., Headon, D. J., Street, S. L., Overbeek, P. A. & Zonana, J. (1999). Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Nat. Genet.* 22: 366-369.
- Montonen, O., Ezer, S., Saarialho-Kere, U. K., Herva, R., Karjalainen-Lindsberg, M. L., Kaitila, I., Schlesinger, D., Srivastava, A. K., Thesleff, I. and Kere, J. (1998). The gene defective in anhidrotic ectodermal dysplasia is expressed in the developing epithelium, neuroectoderm, thymus, and bone. *J. Histochem. Cytochem.* 46: 281-289.
- Morlon, A., Munnich, A., Smahi, A. (2005). TAB2, TRAF6 and TAK1 are involved in NF- κ B activation induced by the TNF-receptor, Edar and its adaptator Edaradd. *Hum. Mol. Genet.* 14: 3751-3757.
- Mustonen, T., Ilmonen, M., Pummila, M., Kangas, A. T., Laurikkala, J., Jaatinen, R., Pispä, J., Gaide, O., Schneider, P., Thesleff, I., *et al.* (2004). Ectodysplasin A1 promotes placodal cell fate during early morphogenesis of ectodermal appendages. *Development.* 131: 4907-4919.
- Nagashima, H., Kuraku, S., Uchida, K., *et al.* (2007). On the carapacial ridge in turtle embryos: its developmental origin, function and the chelonian body plan. *Development.* 134: 2219-2226.
- Naito, A., Yoshida, H., Nishioka, E., Satoh, M., Azuma, S., Yamamoto, T., *et al.* (2002). TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 8766-8771.

- Pispa, J. (2004). Ectodysplasin in Epithelial Morphogenesis: from Tabby to TNFs. Academic Dissertation. University of Helsinki. 1-56.
- Pispa, J., Jung, H. S., Jernvall, J., *et al.* (1999). Cusp patterning defect in *Tabby* mouse teeth and its partial rescue by FGF. *Dev. Biol.* 216: 521-534.
- Pispa, J., Mikkola, M. L., Mustonen, T. and Thesleff, I. (2003). Ectodysplasin, Edar and TNFRSF19 are expressed in complementary and overlapping patterns during mouse embryogenesis. *Gene. Expr. Patterns.* 3: 675-679.
- Pispa, J. and Thesleff, I. (2003). Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev. Biol.* 262: 195-205.
- Srivastava, A. K., Pispa, J., Hartung, A. J., Du, Y., Ezer, S., Jenks, T., Shimada, T., Pekkanen, M., Mikkola, M. L., Ko, M. S., Thesleff, I., Kere, J., and Schlessinger, D. (1997). The *Tabby* phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the EDA gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin-A) with collagenous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 13069-13074.
- Wang, Z., Pascual-Anaya, J., Zadissa, A., *et al.* (2013). The draft genomes of soft-shell turtle and green sea turtle yield insights into the development and evolution of the turtle-specific body plan. *Nat. Genet.* 45: 701-706.
- Weeks, O., Bhullar B.-A. S., Abzhanov, A. (2013). Molecular characterization of dental development in a toothed archosaur, the American alligator *Alligator mississippiensis*. *Evol. Dev.* 15: 393-405.
- Yan, M. H., Wang, L. C., Hymowitz, S. G., *et al.* (2000). Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors. *Science.* 290: 523-527.

Kasutatud raamatud

Darwin, C. 1875. The Variation of Plants and Animals under Domestication, p. 319, 2nd ed., vol. II, John Murray, London.

Hickman, C. P. Jr., Roberts, L. S., Larson, A., l'Anson, H., Eisenhour, D. J. 2006. Integrated Principles of Zoology, p. 551, 13th ed., The McGraw-Hill Companies, Inc.

Gilbert, S. F. 2014. Developmental Biology, p. 82-83, 10th ed., Sinauer Associates, Inc.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anni Rebane (29.11.1990),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Ektodüsplasiini ekspressioon punakõrv-ilukilpkonna Trachemys scripta arengus,
mille juhendajad on Kersti Lilleväli ja Triin Tekko

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 26. maist 2017 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26. mail 2014